Beiträge zur Physiologie des Wurzelpilzes von Limodorum abortivum (L.) Sw.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Philosophischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Haija Blumenfeld

aus Tuckum (Lettland)

Riga 1935.

Spiestuve „Splendid" Rīgā. Kungu ielā 21, tā|r. 27249

Genehmigt von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Abteilung der Philosophischen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. G. Senn u. H. Rupe.

Prof. Dr. A. PORTMANN
Dekan.

Basel, den 4. März 1935.

R. UNIV
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern

in herzlichster Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsübersicht:

Seite

I. Einleitung 5

II. Morphologie von Limodorum und seinem Pilz . 6
1. Limodorum abortivum (L.) Sw. 6
2. Isolierung des Limodorum-Pilzes . . . 7
3. Morphologie des Limodorum-Pilzes . . 7

III. Allgemeine Kulturbedingungen 10
1. Kultur auf den bei Pilzen üblichen Substraten 10
2. Herstellung der Kulturen 10
3. Bestimmung des Trockengewichts . . 10
4. Einfluss der Durchlüftung der Kulturen 11
5. Einfluss der Kolbengrösse 11
6. Grösse der Impfflocken 13
7. Temperatur 14

IV. Spezielle Ernährungsversuche 14
1. Kohlenstoffquellen 14
2. Stickstoffquellen 19
3. Anorganische Nährsalze (Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat) 21
4. Wasserstoffionenkonzentration 23
5. Einfluss des Sauerstoffentzuges . . . 26
6. Assimilation des molekularen Stickstoffs der Luft 28

V. Die gegenseitigen Beziehungen zwischen Limodorum und seiner Mycorrhiza . . 29

VI. Zusammenfassung der Resultate 30

Literatur-Verzeichnis 32

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546702_0151

I. Einleitung.

Das Problem der Wurzelpilze ist schon von vielen Autoren im Hinblick auf zahlreiche Pflanzen erörtert worden. Die Ergebnisse und die Ansichten über die Bedeutung der Mycorhiza gehen jedoch immer noch weit auseinander.

Frank (1888, 1892) erblickte die Bedeutung der Mycorhizapilze für die höhere Pflanze darin, dass sie alle notwendigen Nährstoffe aus dem Boden aufnehmen und der höheren Pflanze vermitteln. Er sagt u. a. (1892, S. 263): „Die gesamte Zufuhr von Wasser und von Nährstoffen, soweit letztere aus dem Boden stammen, verdankt der Baum seinen Mycorrhizapilzen...". Somit werden neben Wasser und anorganischen Verbindungen auch die in der Humusdecke enthaltenen organischen Verbindungen durch den Pilz den Wurzeln der höheren Pflanzen zugeführt.

Nach der Theorie von Stahl (1900) ermöglichen die Mycorrhizapilze dem höhern Symbionten nur die Aufnahme der in den Hyphen weiter verarbeiteten organischen Stickstoffverbindungen in der erforderlichen Menge. Namentlich können im Humus des Waldes Pflanzen ohne Mycorrhiza den Kampf mit den Pilzhyphen, welche die Fähigkeit besitzen, auch sehr kleine Salzmengen zu verwerten, nur dann aufnehmen, wenn sie ein sehr ausgedehntes Wurzelsystem besitzen.

Der dänische Forscher P. Müller (1903) publizierte dann Versuche, die dafür sprachen, dass die Mycorrhiza von *Pinus montana* die Fähigkeit besitze den molekularen Stickstoff der Luft zu binden. Im Hinblick darauf führte Möller (1906) Laboratoriumsversuche mit *Pinus montana, P. silvestris* sowie mit *Eichen* aus. Er konnte aber bei diesen ectotrophen Mycorrhizen keine Bindung von Luftstickstoff feststellen, ebensowenig wie später Melin (1925).

Dagegen hat Ternetz (1904, 1907) an endotrophen Mycorrhizen verschiedener *Ericaceen* die Bindung des molekularen Stickstoffs nachgewiesen. Auch Wolff (1926, 1933) stellte beim Wurzelpilz der *Neottia nidus avis* und mehrerer anderer Orchideen die Fähigket fest, den molekularen Stickstoff zu binden. Holländer (1932) konnte diesen Befund nicht bestätigen.

Die Autoren sind somit bei ihren Versuchen mit Mycorhiza von *Orchideen* zu keinem übereinstimmenden Resultat gelangt, während an der Zuverlässigkeit der Ternetz'schen Resultate an *Ericaceen*-Mycorrhizen nie gezweifelt worden ist.

Nun wäre es aber denkbar, dass nicht alle Mycorrhizen, auch nicht alle diejenigen der *Orchideen,* dieselbe biologische Bedeutung für den höhern Symbionten haben. Diese könnte auch darin bestehen, dass der Pilz aus dem Boden organische Stickstoffverbindungen oder Ammonsalze aufnimmt und sie der

Pflanze zuführt. Tatsächlich gedeihen die Pilze auf solchen Nährböden sehr gut.

Die fast allgemein als richtig anerkannte Anschauung, dass das Verhältnis zwischen Pilz und höherer Pflanze eine Symbiose sei, bedingt die Annahme, dass die höhere Pflanze dem Pilz als Gegenleistung auch etwas liefere, z. B. stickstofffreie organische Stoffe. Diese Theorie ist jedoch nicht bewiesen; es sind darum zur Klärung der gegenseitigen Beziehungen der beiden Symbionten weitere Versuche erforderlich.

Besonders interessant gestaltet sich dieses Problem bei chlorophyllarmen Pflanzen, welche die Fähigkeit zur autotrophen Lebensweise teilweise oder ganz eingebüsst haben, wie z. B. *Monotropa, Neottia, Coralliorhiza* u. a., sodass für sie der Mycorrhiza-Pilz eventuell als Vermittler der im Waldboden enthaltenen Kohlehydrate in Betracht kommen könnte. Mein verehrter Lehrer, Herr Prof. G. Senn, riet mir daher den Wurzelpilz von *Limodorum abortivum,* einer Orchidee, die ebenfalls zu dieser Gruppe gestellt wird, zu untersuchen. Es ist mir eine angenehme Pflicht Herrn Prof. Senn für die Ueberlassung einer Reinkultur des Pilzes und für das Interesse, dass er meiner Arbeit entgegengebracht hat, sowie für die mannigfache Förderung meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen. Ebenso danke ich Herrn Dr. M. Geiger-Huber, Assistent am Botanischen Institut, der mir bei den chemischen und technischen Fragen überaus wertvolle Hilfe geleistet hat.

II. Morphologie von Limodorum und seinem Pilz.

1. Limodorum abortivum (L.) Sw.

Limodorum ist eine Orchidee, deren Blätter eine deutlich reduzierte Spreite haben. In dieser, wie im Stengel enthält sie viele intensiv grün gefärbte Chloroplasten. Da aber die Epidermis durch Anthocyan blau gefärbt ist, erscheint die Pflanze nicht grün, sondern blau-violett bis stahlblau gefärbt. Kocht man ein solches Blatt einige Minuten in Wasser, so wird es grün, da das Anthocyan in Wasser löslich ist und nun den Chlorophyllfarbstoff nicht mehr verdeckt. Auch spektroskopisch lässt sich das Chlorophyll im gekochten Blatt leicht nachweisen. An Schnitten durch Stengel und Wurzeln kann man ausserdem feststellen, dass alle Organe sehr viel Stärke enthalten.

Da sie in der Nähe von Basel, wo ich meine Untersuchungen durchführte, nicht vorkommt, übergab mir Herr Prof. Senn eine Reinkultur des Pilzes, den er aus einem *Limodorum*-Rhizom von den Follaterres (Wallis) im Jahre 1931 isoliert hatte. Es handelte sich nun für mich zunächst darum, eine möglichst günstige Nährlösung zu finden und im weiteren die Wirkung von Qualität und Quantität bestimmter Nährsubstanzen auf den Pilz zu bestimmen und schliesslich festzustellen,

ob diese Mycorrhiza die Fähigkeit hat den molekularen Stickstoff der Luft zu binden. Ausserdem wurde dem Einfluss äusserer Faktoren, z. B. der Sauerstoffzufuhr, der Reaktion der Nährlösung und der Temperatur auf das Wachstum des Pilzes einige Aufmerksamkeit geschenkt. Um nicht auf einen einzigen Stamm des Limodorum-Pilzes angewiesen zu sein, liess ich mir einige Rhizome der Orchidee aus Südfrankreich kommen. Herr Dr. Braun-Blanquet hatte die Freundlichkeit mir solche zukommen zu lassen. Ausserdem hatte ich selbst Gelegenheit ein Exemplar von Limodorum abortivum im Unterwallis bei Euloz, d. h. in der Luftlinie 5 km. nordöstlich von Follaterres zu finden, dessen Wurzelpilz ich ebenfalls kultivierte.

2. Isolierung des Limodorum-Pilzes.

Herr Prof Senn hatte bei der Isolierung des von den Follaterres stammenden Pilzes das Limodorum-Rhizom nach der von Wolff (1926, S. 8) angegebenen Methode mit Alkohol sterilisiert. Ich wandte sie bei den südfranzösischen und bei meinen walliser Pflanzen ebenfalls an, daneben aber auch die Sterilisation mit Bromwasser. Hiebei kamen die mit Seife und Bürste gereinigten Rhizomstücke während 1 Minute in eine 1% Bromwasserlösung zu liegen. Dann spülte ich sie in sterilem Wasser ab und brachte sie in Knop'sche Nährlösung (0,1%), in welcher der Pilz aus den Rhizomstücken herauswachsen konnte.

Um ganz sicher zu sein, den Mycorrhiza-Pilz und nicht etwa einen an der Oberfläche des Rhizoms vorhandenen andern Pilz zu isolieren, wandte ich noch folgende Methode an: frische, in der angegebenen Weise gereinigte und sterilisierte Rhizomstücke zerschnitt ich steril in zwei Teile, stach mit einer sterilen Glaskapillare in das Rindenparenchym ein und brachte deren vorderes, das Rhizomgewebe enthaltende Stück in Knop'sche Nährlösung. Aus dieser wuchs der in der Kapillare enthaltene Pilz nach einiger Zeit heraus. Auf diese Weise erhielt ich aus Pflanzen von drei verschiedenen Standorten unter Anwendung von drei verschiedenen Methoden Reinkulturen der Mycorrhiza von Limodorum abortivum. Diese drei Pilzstämme verhielten sich in den Hauptversuchen sehr ähnlich. Auch mikroskopisch waren zwischen ihnen nur kleine Unterschiede festzustellen (vgl. S. 9). Die Mehrzahl der Versuche führte ich jedoch mit dem von Herrn Prof. Senn isolierten Stamm von den Follaterres durch.

3. Morphologie des Limodorum-Pilzes.

Der Pilz bildet in den subepidermalen Zellschichten von Limodorum abortivum grosse Knäuel, in denen man die einzelnen Hyphen deutlich erkennen kann. In den Nährlösungen wächst der isolierte Pilz in Form von 3—4 µ dicken Hyphen, deren Zellen 15—20 µ lang sind und Tröpfchen fetten Oeles enthalten. In den ersten Tagen der Kultur entwickelt sich der

Pilz untergetaucht; dann bildet er eine zähe Decke, die je nach den Ernährungsverhältnissen nur einen Teil oder die ganze Oberfläche der Nährlösung bedeckt; ausserdem wachsen die Pilzhyphen an den feuchten Wänden des Kolbens hinauf. Nach 2—3 Wochen stellt die Pilzdecke ihr Wachstum ein, obwohl in der Nährlösung, wie Versuche mit solcher gebrauchter Nährlösung beweisen, noch genügend Nährstoffe vorhanden sind. Auch beim Stehenlassen der abfiltrierten, gebrauchten Nährlösung wächst der Pilz aus den vorhandenen Sporen wieder aus und bildet abermals einen Rasen, der dem ersten an Grösse und Dicke allerdings nachsteht.

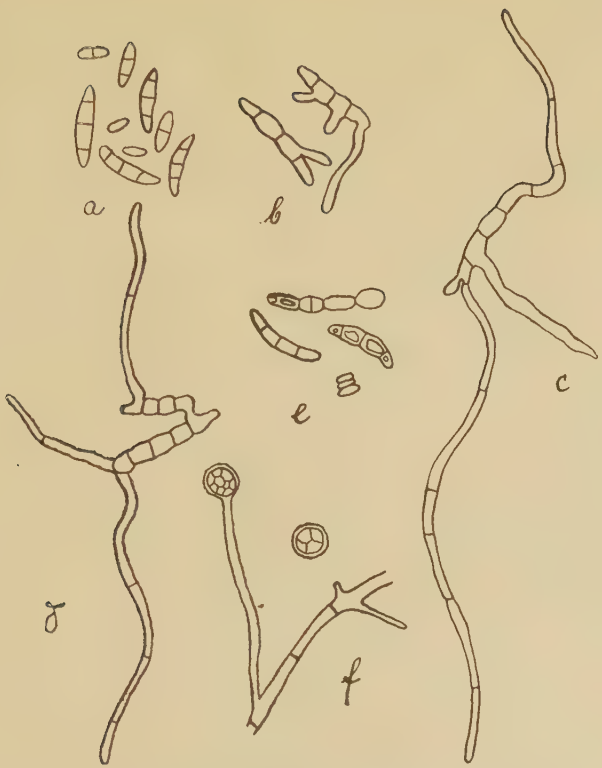
An der Luft und im Licht nimmt das Myzel eine rosa bis dunkel violette Färbung an; im Dunkeln bleibt es dagegen farblos, ausser auf Malzagar, auf dem es auch im Dunkeln tief violett wird. Bei der Kultur unter Senebierschen Glocken (mit roten, grünen, blauen und gelben Lösungen und mit Tuschesuspension zur blossen Abschwächung der Lichtintensität) tritt die Färbung ebenfalls auf. Eine Abhängigkeit der Intensität der Färbung von den verschiedenen Farben des angewandten Lichts konnte somit nicht festgestellt werden.

Auffallender Weise zeigte der vom nahe gelegenen Standort bei Euloz (Wallis) isolierte Pilz eine rotbraune Farbe. Derjenige von Südfrankreich wies eine grüne Färbung auf, welche bisweilen sehr dunkel wurde. In morphologischer Beziehung konnte ich jedoch zwischen diesen verschieden gefärbten Stämmen nur geringe Unterschiede erkennen.

Sehr früh treten in der Kultur vorwiegend interkalar gebildete sichelförmige, querseptierte, hyaline Sporen auf, die bei dem Stamm von Follaterres in eine stumpfe Spitze auslaufen (Fig. 1a), bei demjenigen aus Montpellier dagegen beidendig abgerundet sind. Andere interkalar gebildete Sporen sind kugelig bis ellipsoidisch und enthalten einen dichten, etwas körnigen Inhalt (Fig. 1e). Da diese Sporen besonders in alten, nährstoffarm gewordenen Kulturen auftreten, scheint es sich um Chlamydosporen resp. gemmenartige Gebilde zu handeln, obwohl ihre Membranen nicht dicker sind als diejenigen der sichelförmigen Sporen.

Um das Verhalten der Sporen und ihre Keimung zu studieren, kultivierte ich sie im Hängetropfen von sterilem Hefewasser bei Zimmertemperatur. Schon $2^1/_2$ Stunden nach Anlegen der Kultur zeigten die Sporen deutliche Quellung, an einer Stelle sogar Sprossung (Fig. 1b). Nach weitern $2^1/_2$ Stunden, im ganzen also nach 5 Stunden waren alle Sporen gekeimt und mit längern Keimschläuchen versehen, die regelmässig septiert waren (Fig. 1c). Dabei traten auch Gebilde auf, die wie eine Kopulation zweier Fäden aussahen (Fig. 1d). Nach ca. 10 weitern Stunden zerfielen die Fäden in sichelförmige Sporen; die schliesslich wieder auskeimten. Im Laufe von zwei Tagen wiederholte sich dieser Vorgang drei Mal. Offenbar infolge Nahrungsmangel keimten die Sporen zuletzt nicht mehr (Fig. 1e).

Fig. 1



a. Sporen junger Kulturen interkalar gebildet Vergr. 350.
b. Sporen nach 2½ Stunden. Mit Keimschlauch Vergr. 350.
c. Sporen nach 5 Stunden Kulturdauer Vergr. 350.
d. Kopulationsähnliches Gebilde zweier Hyphen Vergr. 350.
e. Sporen alter, nährstoffarmer Kulturen interkalar gebildet Vergr. 350.
f. Endständige, sporangienartige Gebilde Vergr. 350.

Ausser diesen Sporen fand ich einige Male endständige, Gebilde (Fig. 1f), deren Inhalt geteilt zu sein schien, welchen ich aber nie austreten, resp. keimen sah. Da die Kulturen durchaus sauber geblieben waren, konnte es sich nicht um eine Verunreinigung handeln.

Meine Bemühungen, die Pilz-Stämme zu bestimmen, hatten leider keinen Erfolg. Zu umso grösserem Dank bin ich Frl. Prof. Dr. J Westerdijk verpflichtet, welche die Güte hatte, die Bestimmung duchzuführen. Sie identifizierte den Pilz von Follaterres (Wallis) als *Fusarium oxysporum Schl.*, und denjenigen von Montpellier als *Cylindrocarpon didymum (Hart.) Wr.* Da aber das Mycel dieser Species als gelb bis braun beschrieben wird (Wollenweber 1928, S. 165), ist mein Pilz mit seinem grünen Mycel wohl als eine besondere Rasse des *C. didymum* zu betrachten. Die von mir beobachteten kugeligen Gebilde (Fig. 1f) entsprechen offenbar Mikrogonidien, wie solche für manche Species von *Fusarium* und *Cylindrocarpon* beschrieben worden sind (vgl. Wollenweber 1932 S. 809, Fig. 54—58,

und 1928, S. 63). Da beide Gattungen einander sehr nahe stehen, ist die Uebereinstimmung ihrer Lebensweise als endotrophe Mycorrhizen von *Limodorum* durchaus verständlich. Dass es sich aber bei diesen Pilzen, deren Verwandte als Humusbewohner oder als Krankheitserreger höherer Pflanzen bekannt sind (Wollenweber 1935, S. 118), tatsächlich um die Mycorrhiza von *Limodorum* handelt, ergiebt sich aus der auf Seite 7 erwähnten Tatsache, dass alle drei von mir verwendeten Isolierungsmethoden stets dieselben Pilze geliefert haben.

III. Allgemeine Kulturbedingungen.

1. Kultur auf den bei Pilzen üblichen Substraten.

Bei den ersten Kulturversuchen verwendete ich folgende Nährlösung: Glukose 2%, primäres Kaliumphosphat 1%, Ammoniumnitrat 0,02%, Magnesiumsulfat 0,2%. Diese Nährlösung hatte sich bei der Kultur anderer Pilze, z. B. bei den von Ternetz (1906) untersuchten Mycorrhizen von *Ericaceen* bewährt, sowie bei den Pilzen von *Neottia, Coralliorrhiza, Cattleya* und *Laelia,* die Wolff (1926, 1933) kultiviert hat. Die zur Herstellung der Nährlösung verwendeten Chemikalien stammen von Merck und Kahlbaum und waren garantiert rein.

Neben dieser künstlichen Nährlösung verwendete ich als natürliche Nährböden, Bananen, Kartoffeln, Aprikosen, Rosinen, Kastanien und Malzagar. Gutes Wachstum erfolgte auf Malzagar, Bananen und Kartoffeln, schwächeres auf den sauern Früchten. Eine eigenartige dunkel-violette Farbe, die derjenigen der Limodorum-Pflanze sehr ähnlich und übrigens für *Fusarium oxysporum* charakteristisch ist, bildete der Pilz auf Malzagar aus. Dabei war es gleichgültig, ob er im Dunkeln oder im Licht kultiviert wurde.

2. Herstellung der Kulturen.

Für die Kultur in flüssigem Medium wurden weitbauchige Kolben von ca 500 cc Inhalt verwendet, zum Teil mit engem, zum Teil mit weiterem Hals. In diese Kolben füllte ich jeweilen 200 cc der zu verwendenden Nährlösung, verschloss sie mit Wattestopfen und setzte diesen, um ihr Feuchtwerden beim Sterilisieren zu verhindern, Stanniolkappen auf. Die Sterilisation erfolgte im Dampftopf und zwar während 40 Minuten vom Zeitpunkt des Siedens an, jeweils an drei aufeinander folgenden Tagen. Am vierten Tage wurden die Kolben geimpft, wieder mit Stanniolkappen versehen und in einen Schrank gestellt. Beim Abschluss der Kulturen wurden diese durch Impfen auf Nährgelatine-Platten und durch mikroskopische Untersuchung der ausgefärbten Präparate auf Reinheit, speziell auf das Vorhandensein von Bakterien geprüft.

3. Bestimmung des Trockengewichts.

Das Trockengewicht wurde in der Weise bestimmt, dass das vorher auf dem Filter ausgewaschene Mycel in gewogene Wägegläschen gebracht und bis zur Gewichtskonstanz im elektrischen Ofen bei 95—105° C. getrocknet wurde.

4. Einfluss der Durchlüftung der Kulturen.

Der Umstand, dass der Pilz auf der Nährlösung eine Decke bildet, spricht dafür, dass er zu seinem Wachstum Luft nötig hat. Es stellte sich daher die Frage nach der Bedeutung der Sauerstoff-Versorgung und der Grösse der Oberfläche der Nährlösung (Kolbengrösse). Obwohl die Atmosphäre der Kolben mit der Aussenluft durch den Wattestopfen in Verbindung stand, leitete ich bisweilen Luft durch die Kulturen, um sicher zu sein, dass der Sauerstoff in genügender Menge vorhanden sei, und um anderseits die Atmungskohlensäure aus den Kolben auszuspülen. Falls der Pilz den atmosphärischen Stickstoff überhaupt verwenden sollte, konnte dieser auf keinen Fall in zu geringer Menge vorhanden sein, da ja die Luft zu 79 Volum-Prozent aus Stickstoff besteht und die Kolben ca 300 cc Luft fassen. Ausserdem hatte Wolff (1926, S. 23) festgestellt, dass der Luftstickstoff von seinem *Orchideen*-Pilz nur in Bruchteilen eines Milligramms aufgenommen wird.

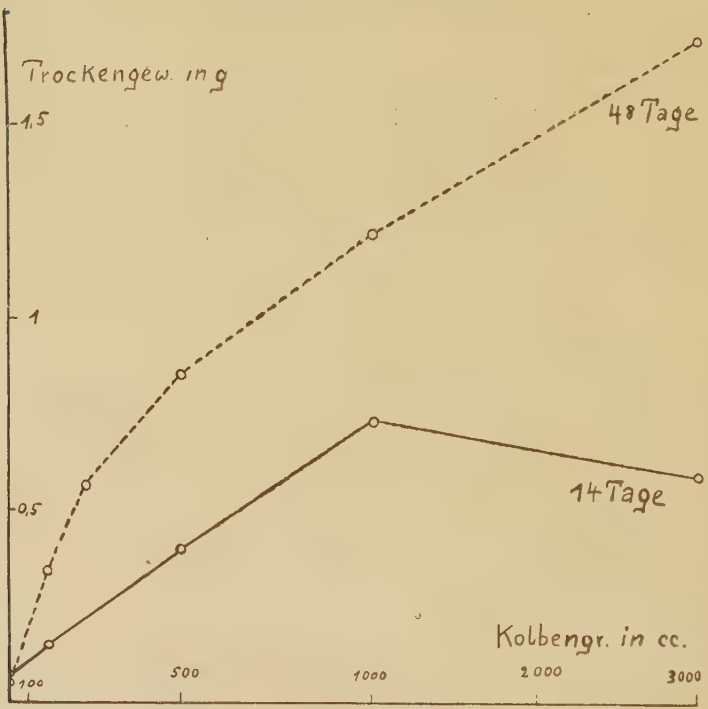
Die durch die Kulturkolben geleitete Luft wurde einer Stahlflasche entnommen, in der sie in komprimiertem Zustand enthalten war. In Folge dessen konnte sie durch die Kolben gepresst werden. Bevor sie in diese gelangte, passierte sie Schwefelsäure, Kaliumpermanganat, dann steriles destilliertes Wasser und schliesslich ein steriles Wattefilter. Diese Durchlüftung, bei welcher die Luft durch die Kulturen gepresst wird, hat den grossen Vorteil, dass, wenn in der Luftleitung irgendwo eine Undichtigkeit vorhanden ist, dort nur gereinigte Luft austritt. Wird die Luft dagegen durchgesogen, so kann bei Undichtigkeit nicht gereinigte Luft in die Kolben eintreten, die Kulturen unter Umständen infizieren oder flüchtige Verbindungen, auch Ammoniak, einführen, deren Wirkung auf den Pilz nicht kontrolliert werden kann. Anfangs liess ich die Luft durch die Nährlösungen durchperlen; nach wenigen Tagen war aber der Pilz in die Zuleitungsröhre hineingewachsen und hatte sie völlig vorstopft, so dass der Versuch unterbrochen werden musste. Darum liess ich in den späteren Versuchen die Luft nur über die Oberfläche der Nährlösung streichen und schüttelte die Kolben von Zeit zu Zeit, um den Austausch der Luft zwischen Nährlösung und Atmosphäre zu beschleunigen. In allen auf diese Weise durchlüfteten Versuchen erhielt ich—offenbar in Folge der mechanischen Störung — ein viel kleineres Trockengewicht des Pilzes als bei den nicht durchlüfteten Kulturen. (Z. B. 0,54 gr. gegenüber 1,65 gr.). Ich habe daher die Kulturen später nicht mehr durchlüftet.

5. Einfluss der Kolbengrösse.

Es galt ferner festzustellen, ob die Grösse des Versuchskolbens auf das Wachstum resp. auf die Grösse des Pilzgewichts von Einfluss sei. Es wäre auch möglich, dass das Wachstum von der Grösse der Oberfläche der Nährlösung, auf welcher der Pilz mit der Luft in Berührung kommt, abhängig

ist, und dass er nach völliger Ueberwachsung der Oberfläche sein Wachstum einstellt. Darum setzte ich Versuche mit Kolben von verschiedener Grösse an. (Fig. 2). Da nach den Literaturangaben z. B. von Wolff (1926, S. 7), Holländer (1932, S. 28)

Fig. 2 **Einfluss der Kolbengrösse auf das Trockengewicht.**
Kulturdauer: 1.VIII — 15.VIII.33 = 14 Tage.
22.XI.33 — 9.I.34 = 48 Tage.
Gewöhnliche Nährlösung.



und andern Autoren viele Versuche mit Erlenmeyerkolben von 150—200 cc. ausgeführt worden sind, verwendete ich auch solche; ausserdem aber auch kleinere und grössere. In kleinen Erlenmeyerkolben von 50 cc. Inhalt mit 10 cc. Nährlösung trat nur schwaches Wachstum ein (Trockengewicht=0,05 gr.). Bei Zunahme der Kolbengrösse und grösserer Menge Nährlösung bis zu 220 cc. erfolgte eine starke Zunahme des Wachstums. In einem 1-literigen Erlenmeyerkolben mit 220 cc. Nährlösung war das Wachstum fast gleich gut wie in den Kulturkolben mit weit ausladendem Bauch von 500 cc, die ich gewöhnlich für meine Versuche verwendete.

Um festzustellen, ob dieses Resultat durch die Oberflächengrösse oder die Schichtdicke der Flüssigkeit bedingt sei, variierte ich zunächst die Schichtdicke bei gleichbleibender Oberfläche. Das Resultat war, dass bei geringer Schichtdicke (50 cc. Nährlösung in einem Becherglas von 500 cc.) geringes Wachstum erfolgte: Trockengewicht= 0,32 gr. Bei grössern Schichtdicken (100—400 cc. in gleich grossen

Gläsern) nahm das Trockengewicht nicht mehr zu, wenn dem Pilz 100 cc. und mehr Nährlösung geboten worden war. (Trockengewicht =0,6—0,7 gr. siehe Tab. 1).

Tab. 1. **Einfluss der Schichtdicke auf das Trockengewicht.**

Kulturdauer 28.III — 15.V.34 = 47 Tage.

Gewöhnliche Nährlösung; pH bei Beginn des Versuchs 4,5. Nesslers Reaktion nach Abschluss der Versuche überall positiv; Zuckernachweis mit Fehling'scher Lösung nur bei grossen Flüssigkeitsmengen.

Kolb.	Menge d. Nährlösg.	Schichtdicke in cm.	Bei Abschluss d. Versuchs pH	Fehling	Trock. Gew.
1	50 cc	1,30 cm	7,15	—	0,29
2			7,15	—	0,35
1	100 cc	2,50 cm	6,75	—	0,70
2			6,70	—	0,70
1	200 cc	4,80 cm	6,30	+	0,58
2			6,20	+	0,60
1	400 cc	9,30 cm	5,85	+	0,68
2			5,85	+	0,69

Die Schichtdicke hatte somit bei einer Nährlösungsmenge von 100 cc und mehr keinen Einfluss auf die Grösse des Trockengewichts. Bei der geringen Nährlösungsmenge von 50 cc. wird dagegen das Wachstum nach einiger Zeit in Folge von Nahrungsmangel eingestellt.

Die Oberflächengrösse wurde durch die Kultur des Pilzes in verschieden grossen Erlenmeyerkolben variiert. Das Trockengewicht nahm mit zunehmender Oberfäche bis zu einem Maximum ständig zu. Da das Trockengewicht des Pilzes aus einem 1 Liter - Erlenmeyerkolben dem Trockengewicht aus dem weitbauchigen Kulturkolben von ca 500 cc Inhalt ungefähr gleich kam, wurden letztere für alle Versuche verwendet, da sie beim Sterilisieren weniger Platz einnehmen und wegen ihrer geringen Höhe für das Impfen viel praktischer sind.

6. Die Grösse der Impfflocken.

Da die Pilzdecke der Kultur ziemlich zähe ist und es trotz aller Sorgfalt und aufgewandter Mühe nicht immer gelang, genau gleich viel Material zu verimpfen, habe ich auch den Einfluss verschieden grosser Impfflocken auf das Wachstum des Pilzes untersucht. Dabei verwendete ich kaum sichtbare Mengen bis zu 3—4 cm^2 grosse Flocken. Dies sind Unterschiede, wie sie bei der Impfung der Nährlösung sonst nie vorkamen. In den ersten Tagen war der Unterschied im Wachstum ziemlich deutlich: die Kolben mit mehr Impfmaterial zeigten grössere Myzelien als die andern. Nach etwa 10 Tagen hatten sich aber diese Unterschiede ausgeglichen und beim Abschluss der Versuche fand ich in den Trockengewichten nur unbedeutende Unterschiede.

7. Temperatur.

Die Versuche wurden zunächst bei Zimmertemperatur ausgeführt (20—22° C). Da aber deren Höhe durchaus zufällig ist, habe ich auch Versuche bei niedrigeren und bei höheren Temperaturen angesetzt. Solche von 30—32° C bewirken schnelles Auswachsen des Pilzmyzels; aber beim Abschluss der Versuche war das Trockengewicht viel kleiner, als bei den Kulturen, die gleichzeitig bei Zimmertemperatur (20—22° C) gehalten worden waren. Nach dem makroskopischen Aussehen dieser Kultur zu schliessen, war im Myzel Autolyse eingetreten; dafür sprach auch das mikroskopische Bild. Eine Temperatur von 25° C ist etwas günstiger als 30° C, aber das Trockengewicht ist immer noch kleiner als das bei 20—22° C erhaltene.

Andere Kulturen brachte ich nach dem Impfen in eine Temperatur von ca 0°C (—2 bis + 5° C). Im Laufe mehrerer Wochen waren keine Anzeichen eines Wachstums zu beobachten. Dieselben Kulturen in die gewöhnliche Temperatur von 21° C gebracht liessen schon nach wenigen Tagen deutliches Wachstum erkennen. Das Myzel war also nicht tot, sondern wuchs normal, erreichte aber die gewöhnliche Höhe des Trockengewichts nicht ganz, indem dieses nur 0,78 gr. betrug.

IV. Spezielle Ernährungsversuche.

Da für die Vorversuche eine willkürlich gewählte Nährlösung verwendet worden war, und man annehmen kann, dass jeder Pilz zu seiner optimalen Entwicklung eine bestimmte Nährlösung braucht, galt es nun, eine für das Wachstum des Limodorum-Pilzes optimale Nährlösung zusammenzustellen. Zu diesem Zwecke variierte ich die C-Quellen, die N-Quellen und die übrigen Nährstoffe quantitativ und qualitativ.

1. Kohlenstoffquellen.

Bei der quantitativen und qualitativen Variierung der C-Quellen wurde die Zusammensetzung der übrigen Nährstoffe (Ammoniumnitrat, Kaliumphosphat und Magnesiumsuflat) konstant gehalten. Als Kohlenstoffquellen verwendete ich Mono-, Di- und Polysaccharide, Glukoside und organische Säuren (Tab. 2) Sehr gutes Wachstum erfolgte bei Verabreichung löslicher Kohlenhydrate: Maltose, Saccharose, Galaktose, Fruktose und Glukose in einer 3- resp. 2%igen Lösung. Als weniger günstig erwiesen sich einige Glukoside und verschiedene organische Säuren (Tab. 2 und 3). Gar kein Wachstum erfolgte auf Harnstoff und Acetamid. Wurde der anorganischen Stammlösung Chinasäure als Kohlenstoffquelle zugesetzt, so erfolgte in den ersten fünf Wochen kein Wachs-

Tab. 2 **Einfluss verschiedener C-Quellen.**

Diese sind in einer Konzentration von 3% in der sonst C-freien, normalen Nährlösung enthalten. Kulturdauer 9.XI. — 5.XII 1933 = 26 Tage. Beim Abschluss der Versuche konnten in den Nährlösungen mit dem Nessler'schen Reagens immer noch NH_4—Verbindungen nachgewiesen werden.

Kolb.	C—Quellen	Zu Beg. pH.	Beim Abschluss d. Versuche pH.	Zuckergehalt	Trock. Gew.
1	Saccharose	4,35	5,55	—	1,48
2			5,75	—	1,13
1	Glukose	4,37	6,35	—	1,04
2			6,15	—	0,91
1	Maltose	4,48	6,30	—	1,27
2			6,50	—	1,20
1	Lactose	4,55	4,30	+	0,10
2			4,35	+	0,11
1	Fructose	4,30	6,55	—	1,32
2			6,55	—	1,53
1	Galactose	4,20	6,35	—	0,777
2			6,00	—	1,227
1	Amygdalin	4,43	4,45	+	0,07
2			4,40	+	0,06
1	Aesculin	—	2,90	—	0,68
2			2,95	—	0,72
1	Salicin	4,60	6,00	Spur.	0,06
2			5,90	Spur.	0,07
1	K-tartrat	5,48	8,65		0,61
2			8,45		0,667
1	K-oxalat	5,40	—		0
2					0
1	Chinasäure	3,25	3,45		1,14*)
2			3,20		0,77
1	Stärke	4,65	5,85		0,366
2			5,65		0,325
1	Tannin	3,8	—		0
2					0

*) Dieser Wert des Trockengewichts wurde nach 9-wöchiger Kulturdauer festgestellt. Die meisten dieser Versuche wurden auch vom 4.—16.VIII 1933, und vom 9.XI—5.XII 1933 durchgeführt. Sie ergaben dasselbe Resultat.

tum (Tab. 3). Erst nach dieser Zeit setzte es allmählich ein und dauerte etwa 5 Wochen. Dann hörte es auf, doch behielt der Pilz noch 3 Monate lang dasselbe Aussehen bei, was sonst beim Limodorum-Pilz nicht der Fall ist, da schon nach etwa 5 Wochen Autolyse eintritt. Ausserdem zeigte der Pilz auf Chinasäure ein anderes Verhalten als gewöhnlich: er wuchs ausschliesslich untergetaucht und bildete einen watteähnlichen, den Kolben bis zu Dreivierteln des Flüssigkeits-Volumens einnehmenden Bausch. Sein Aussehn glich dem des *Neottia*-Pilzes, wie er von Wolff (1926, Fig. 7) beschrieben und abgebildet wurde und wie ich es auch an meinen aus Neottia-Wurzeln isolierten Pilzen feststellen konnte.

Tab. 3 **Einfluss von Säuren, Alkohol und organischen Stickstoffverbindungen als C-Quellen.**

Diese sind in einer Konzentration von 2% in der sonst C-freien normalen Nährlösung enthalten.

Kulturdauer: 16.I—22.II 1934 = 37 Tage.

Kolb.	C—Quellen	pH zu Beginn	pH bei Abschluss	Trock. Gew.
1	K—tartrat	5,40	9,25	0,32
2			9,15	0,34
1	K—oxalat	5,37	—	0
2			—	0
1	K—citrat	6,10	9,20	0,41
2			9,10	0,51
1	Na—acetat	5,85	—	
2			8,75	0,53
1	Chinasäure	2,80	—	0
2			—	0
1	Glycerin	4,25	2,65	0,41
2			2,70	0,63
1	Alkohol	4,30	4,35	0,22
2			4,30	0,06
1	Acetamid	4,55	4,90	0,01
2			4,85	0,01
1	Asparagin	4,10	8,65	0,22
2			8,70	0,31
1	Harnstoff	6,15	—	0
2			—	0
1	PeptonWitte	4,45	8,45	0,56
2			8,45	0,70

Von besonderem oekologischem Interesse ist die Frage, ob der Pilz Zellulose angreifen kann, da Limodorum ja im Walde wächst, wo dem Pilz in Form von abgefallenen Blättern und Nadeln viel Zellulose zur Verfügung steht. Auf den von C-freier Nährlösung nur benetzten, jedoch nicht völlig untergetauchten Filtrierpapierstücken zeigte er gutes Wachstum. Die mikroskopische Untersuchung liess eine deutliche Veränderung des Filtrierpapiers erkennen: es war von Pilzhyphen völlig durchwachsen und bildete eine breiige Masse, die nur noch aus einzelnen Fasern bestand, welche fast keinen Zusammenhang mehr mit einander hatten. Das untergetauchte Papier dagegen war nicht angegriffen worden, sondern hatte seine Konsistenz völlig beibehalten. Dabei wurde sogen. quantitatives aschenfreies Filtrierpapier von Schleicher und Schüll (No. 589) verwendet. Dieses ist infolge der Reinigungsprozedur gegenüber nativer Zellulose vielleicht etwas verändert, wenigstens färbt Jod-Jodkali dieses Papier bläulich violett. In Vorversuchen ist der Pilz auch auf gewöhnlichem Filtrierpapier gut gewachsen.

Tab. 4 **Wachstum auf Oblaten als C-Quelle in sonst C-freier, normaler Nährlösung.**

Kulturdauer 5.VI—13.VII 1935 = 38 Tage.

Beim Abschluss des Versuches konnten in der Nährlösung mit Nesslers Reagens stets NH_4—Verbindungen nachgewiesen werden, jedoch mit Fehling'scher Lösung keine reduzierenden Zucker. pH bei Beginn des Versuchs: 4,5.

Kolb.	Oblaten in Gr.	pH bei Abschluss des Versuchs	Trock. Gewicht
1	0,25	—	—
2		6,15	0,11
1	1	6,50	0,35
2		6,50	0,34
1	3	6,85	1,13
2		6,90	1,07

Derselbe Versuch wurde vom 28.III—28.V 1934 durchgeführt; er ergab prinzipiell dieselben Resultate.

Als gute C-Quelle erwiesen sich ferner Oblaten in einer Dosierung von 3 gr. in 100 cc Nährlösung. Bei schwächerer Dosierung war das Wachstum bedeutend kleiner. (Tab. 4).

Als weitere Kohlenstoffquellen untersuchte ich Stärke und Pektin. Beide Stoffe wurden vom Pilz angegriffen. Bei geringem Zusatz von Stärke (0,25 gr. in 100 cc C-freier Nährlösung) erreichte der Pilz zwar nur ein Trockengewicht von 0,06 gr.; bei einer Zugabe von drei Gramm jedoch ein solches von 0,75 gr. Weniger gut wuchs er auf Pektin, das nach Behrens und Störmer (s. Löhnis 1910, S. 114 und 1911, S. 108) aus zerriebenen Rüben durch Extraktion mit heissem chloroformhaltigem Wasser und nachfolgender Behandlung mit Natronlauge gewonnen worden war.

Da die Glukose für die Kultur des Pilzes besondere Vorteile bot, — erhält man sie doch ganz rein und zu niedrigerem Preis als z. B. Fruktose—, suchte ich durch Veränderung der Konzentration auch mit dieser Kohlenstoffquelle ein ebenso intensives Wachstum wie mit Maltose und Fruktose zu erzielen. Nach den Angaben der Literatur zu schliessen (Wolff 1926, S. 14, Küster 1913, S. 98, Janke und Zickes 1928, S. 49) wurde bei den Pilzen die Glukose am häufigsten in einer Konzetration von 2% verwendet. Ich fand aber, dass der Limodorum-Pilz bei einer höheren Konzentration, d. h. von 5—10% mehr Trockensubstanz bildet als bei 2%. Das Optimum lag um 5% (Fig. 3). Bei höhern Konzentrationen verändert sich das Trockengewicht nicht mehr viel; bei 20—25% Glukose fängt es sogar an abzunehmen. Dies zeigte sich besonders bei längerer Dauer des Versuchs. Während nämlich in 2% Glukose nach einem anfänglichen raschen Anstieg des Trockengewichts das Maximum (1,6 gr.) nach ca. 12 Tagen erreicht worden war, betrug es nach 26 Tagen nur 0,93 gr. und nach 54 Tagen nur noch 0,84 gr., somit nur noch die Hälfte des

Fig. 3. **Einfluss der Glukose-Konzentration auf das Trockengewicht.**

Kulturdauer: 16.VII—30.VII 1932=14 Tage.
5.VII— 2.VIII 1933=28 Tage.

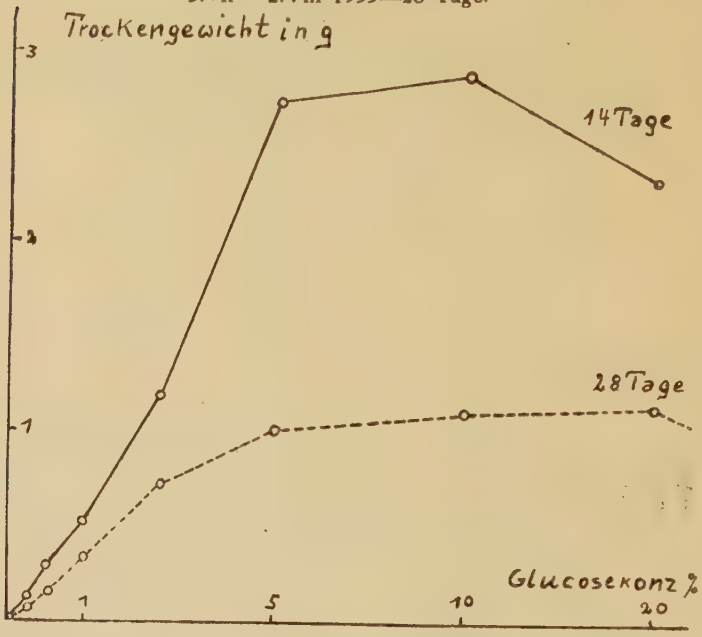
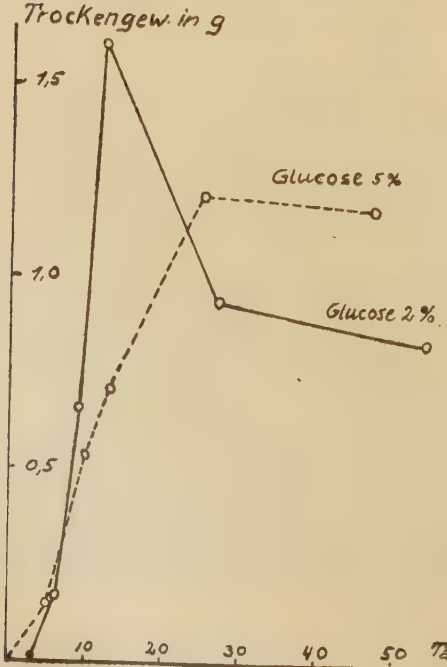


Fig. 4. **Einfluss der 2- und 5%-igen Glukoselösung bei längerer Dauer des Versuchs.**

Gewöhnliche Nährlösung.



Maximalwertes. Wurde dagegen eine 5%-ige Glukoselösung gegeben, so wurde das Maximum (1,21 gr.) zwar erst nach 25 Tagen erreicht, blieb dann aber bis zu 47 Tagen konstant, und lag wesentlich höher als in den Versuchen mit 2%-iger Glukoselösung (Fig. 4). Darum habe ich für alle weitern Versuche die Glukose in 5% Lösung verwendet. Nach Abschluss der Versuche konnte ich in der Nährlösung mit Fehling'scher Lösung in vielen Fällen noch Zucker nachweisen.

2. Stickstoffquellen.

In gleicher Weise wie die Wirkung der Kohlenstoffquellen wurde auch diejenige der Stickstoffquellen untersucht. Als solche kamen in Frage: Nitrate, Nitrite, Ammoniumsalze und organische Stickstoffverbindungen. Gutes Wachstum wurde mit dem Nitrat und Phosphat des Ammoniums, weniger gutes mit dessen Chloriden und Sulfaten erhalten (Tab. 5)

Auch die meisten organischen Ammoniumverbindungen waren als Stickstoffquellen gut ausnützbar, z. B. Weinsaures, Aepfelsaures und Ameisensaures Ammonium (Tab. 6).

Tab 5 **Einfluss von Nitraten und Ammonsalzen als N-Quellen in sonst normaler Nährlösung.**

Kulturdauer: 13.VII—11.VIII 1933 = 28 Tage.

Kolb.	N—Quellen	pH bei Beginn d. Vers.	pH. bei Abschl. d. Vers.	Fehling	Nessler	Trock. Gew.
1	$Ca(NO_3)_2$	4,10	6,35	—	+	1,71
2			6,45	—	+	1,63
1	KNO_3	4,25	7,25	—	+	1,14
2			7,05	—	+	1,40
1	$NaNO_3$	4,25	7,50	—	+	1,03
2			7,15	—	+	1,55
1	NH_4NO_3	4,15	6,95	—	+	0,87
2			7,00	—	+	0,89
1	NH_4Cl	4,25	2,45	Spur	+	0,40
2			2,35	+	+	0,53
1	$(NH_4)_2SO_4$	4,15	2,40	+	+	0,47
2			2,45	+	+	0,40
1	$(NH_4)_3PO_4$	4,45	3,00	—	—	1,39
2			verunr.	—	—	1,45

Dieselben Versuche wurden am 13.XI—13.XII = 30 Tage durchgeführt; sie ergaben dasselbe Resultat.

Sehr gutes Wachstum erfolgte bei Zugabe von Asparagin (Tab. 6). Ich muss allerdings die Frage offen lassen, ob dieses nicht teilweise auch als C-Quelle gedient hat. In Asparaginsäure dagegen betrug das Trockengewicht nur ein Drittel des in Asparagin erhaltenen. Gut wirkt dagegen der Harnstoff als Stickstoff-Quelle.

Wenn aber gar keine Stickstoff-Verbindun-

gen geboten und wenn die übrigen Nährstoffe in chemisch reinster Form angewendet wurden, war kein Wachstum zu konstatieren.

Um die optimale Konzentration der Stickstoff-Verbindungen festzustellen, verwendete ich Ammoniumnitrat, weil diese Stickstoff-Quelle dem Pilz zugleich oxydierten und reduzierten Stickstoff bietet. Die günstigste Konzentration liegt zwischen 0,3 und 2% (Fig. 5). In diesem Intervall waren im Trockengewicht nur schwache Unterschiede zu verzeichnen,

Tab. 6 **Einfluss verschiedener N-Quellen.**

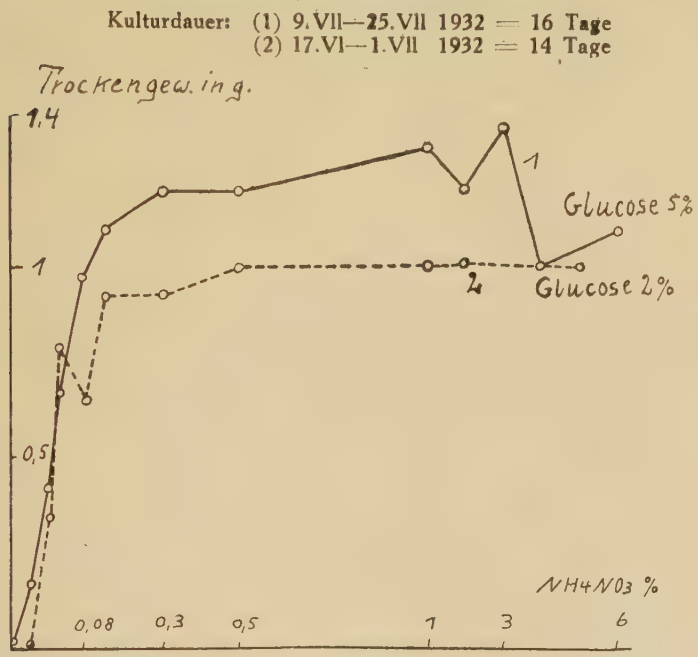
in der Konzentrat. von 0,5% in der normalen Nährlösung, Glukose 2%.
Kulturdauer: 2.VII—14.VII 1932 = 12 Tage

Kolb.	N—Quellen	Anf. pH	Schl. pH	Trock. Gew.
1	$(NH_4)_2\ CO_3$	4,95	6,10	1,23
2		4,95	6,10	1,24
1	$NH_4H_2\ PO_4$	4,95	6,02	1,23
2			5,98	1,265
1	$(NH_4)_2HPO_4$	4,85	2,60	1,215
2			2,58	1,25
1	$(NH_4)_2\ SO_4$	4,35	2,60	0,87
2			2,60	0,775
1	NH_4Cl	4,40	2,55	0,755
2			2,60	0,67
1	NH_4NO_3	4,60	6.05	1,34
2			5,82	1,364
1	Oxal—NH_4	4,95	5,83	1,234
2			5,55	0,969
1	Wein—NH_4	4,60	6,20	1,58
2			6,20	1,615
1	Essig—NH_4	4,85	4,95	0
2			4,95	0
1	Apfel$(NH_4)H$	4,15	6,27	1,901
2			5,70	1,885
1	Ameis. NH_4	4,95	6,05	0,93
2			6,32	1,417
1	Valerian NH_4	4,50	—	0
2				0
1	Harnstoff	5,00	6,00	1,075
2			6,00	1.04
1	Asparagin	4,50	6,08	1,655
2			6,05	1,55
1	Asparag.Säur.	3,20	3,30	0,488
2			3,22	0,662
1	Ohne N-Qu.	4,6	4,45	0,123
2			4.45	0,02

Die ersten 8 Versuche wurden auch vom 23.III—29.IV 1932 und vom 3.VI—22.VI 1932 durchgeführt. Sie ergaben dasselbe Resultat wie das in Tab. 6 enthaltene.

während dieses in höhern Konzentrationen abnahm. Bei niedrigeren Konzentrationen bis zu 0,15% war das Ammoniumnitrat nach 16-tägiger Kultur aus der Nährlösung völlig verschwunden. Von 0,15% an konnte ich mit Nesslers Reagens nach 47 Tagen in der Kultur noch Spuren von NH_4-Verbindungen nachweisen.

Fig. 5. **Einfluss der Konzentration des Ammoniumnitrats bei verschiedenem Glukose-Zusatz.**



3. Anorganische Nährsalze.

In derselben Weise wie bei den Kohlenstoff- und Stickstoff-Verbindungen wurde auch die Wirkung anorganischer Salze untersucht. Von solchen kamen zunächst Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat als die wichtigsten in Betracht.

a. Kaliumphosphat.

Wenn Kaliumphosphat fehlt, erfolgt nur sehr geringes Wachstum (Trockengewicht — 0,065 gr.). Mehrere Versuche, in denen verschiedene Konzentrationen des Kaliumphosphats bei gleichbleibender Konzentration der andern Salze angewendet wurden, zeigten, dass schon kleine Mengen dieses Salzes

genügen, um das Wachstum wesentlich zu födern. (Fig. 6). Die optimale Konzentration des Kaliumphosphats war schon bei 0,1% erreicht. Bei Zugabe grösserer Mengen als 0,3% nahm das Wachstum nicht mehr wesentlich zu. Trotzdem gab ich immer 1% Kaliumphosphat in die Nährlösung, damit der Pilz an diesem Salz Ueberschuss hatte.

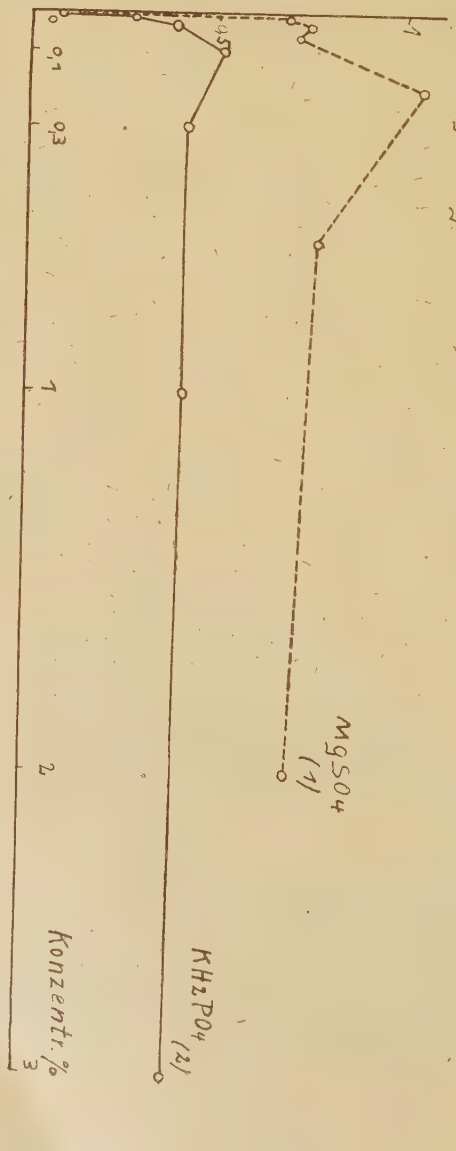
b. Magnesiumsulfat.

In einer Nährlösung ohne Magesiumsulfat ist bei Anwesenheit aller andern Salze das Wachstum etwas stärker (Trockengewicht = 0,133 gr.) als bei Abwesenheit von Kaliumphosphat,

Fig. 6

Einfluss verschiedener Konzentrationen von Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat.

Kulturdauer: (1) 28.III — 21.IV 1933 = 23 Tage
(2) 28.III — 19.IV 1933 = 21 Tage



Dieselben Versuche wurden am 8.VI — 29.VI 1933 wiederholt; sie ergaben dasselbe Resultat.

aber im Vergleich zu den gewöhnlichen Ernten doch sehr gering. Auch von Mg SO_4 genügen schon kleine Mengen, um das Wachstum bedeutend zu steigern. Die optimale Konzentration des Magnesiumsulfats lag um 0,2% (Fig. 6). Ich wandte darum in allen weitern Versuchen diese Konzentration an.

Auf Grund der bisher besprochenen Versuche gab ich der Nährlösung für den Limodorum-Pilz folgende Zusammensetzung: Glukose=5%, Ammoniumnitrat=0,5%, Kaliumphosphat=1% und Magnesiumsulfat=0,2%. Manchmal gab ich zu dieser Nährlösung noch ein Paar Tropfen einer Eisenchlorid-Lösung; einen Einfluss dieses Salzes auf das Wachstum und das Aussehen des Pilzes konnte ich jedoch nicht feststellen.

4. Wasserstoffionen-Konzentration.

Ausser den Salzen mussten bei der Kultur des Pilzes noch andere Faktoren berücksichtigt und variiert werden, deren Einfluss von grosser Bedeutung sein konnte. Als ein solcher Faktor kam die Wasserstoff-Ionen-Konzentration (CH) in Betracht. Ich bestimmte sie mit dem Doppelkeil-Kolorimeter nach Bjerrum und mit den Indikatoren nach Clark und Lubs. Das Kolorimeter stammte von der Firma Lautenschläger, München.

a. Gepufferte Lösungen.

Um den Einfluss der Wasserstoff-Ionen-Konzentration zu prüfen, stellte ich Pufferlösungen (aus primärem und sekundärem Phosphat, teilweise auch unter Zugabe von Säuren oder Basen) mit verschieden hoher CH her, die dank der Pufferung während des Versuchs mehr oder weniger konstant blieb. Das pH wurde zwischen 3,7—9,5 mit vielen Zwischenstufen variiert. Diese Versuche (vom 31.I—21.II 1933 und vom 16.V—10.VI 1933) ergaben, dass ein pH von 3,70—4,05 für das Wachstum nicht günstig ist (Trockengewicht = 0,042 — 0,087 gr.). Erst bei einem pH von 4,30 war das Wachstum besser (Trockengewicht — 0,62 — 0,777 gr.). Das grösste Trockengewicht, nämlich 0,812 — 1,447 gr. wurde bei einem pH von 5,25—7,50 erreicht.

b. Nicht gepufferte Lösungen.

In den normalen Nährlösungen entsprach die Wasserstoff-Ionen-Konzentration vor dem Impfen einem pH von ungefähr 4,5. Beim Abschluss der Versuche, in welchen als Stickstoffquelle NH_4NO_3 geboten worden war, ergab sich meist eine Erhöhung in der Richtung nach dem Optimum hin, nämlich auf pH 6,1—7,4 (Versuche vom 17.VI—1.VII 1932 und vom 9.—25.VII 1932). Enthielt die Nährlösung andre Stickstoffquellen, z. B. $(NH_4)_2SO_4$, KNO_3 oder Asparagin, so zeigte das pH am Schluss des Versuchs ungefähr denselben Wert wie zu Beginn (Versuch vom 11.II—1.III 1932).

Es interessierte mich nun auch zu erfahren, wie sich das pH im Laufe der Kultur, d. h. zwischen Beginn und Abschluss des Versuches verhalte. Zu diesem Zwecke setzte ich eine grössere Zahl gleicher Kulturen an und nahm von diesen von Zeit zu Zeit zwei Kolben heraus, um sie auf pH, Zucker, NH_4-Verbindung und Trockengewicht zu untersuchen. Schon nach 2 Tagen wird die Nährlösung saurer; das pH geht nämlich auf 4,10 herunter und beträgt am 6ten Tag nur noch 2,9 (Fig. 7). Dieser Wert bleibt bis zum 12ten Tag erhalten; von diesem Zeitpunkt an

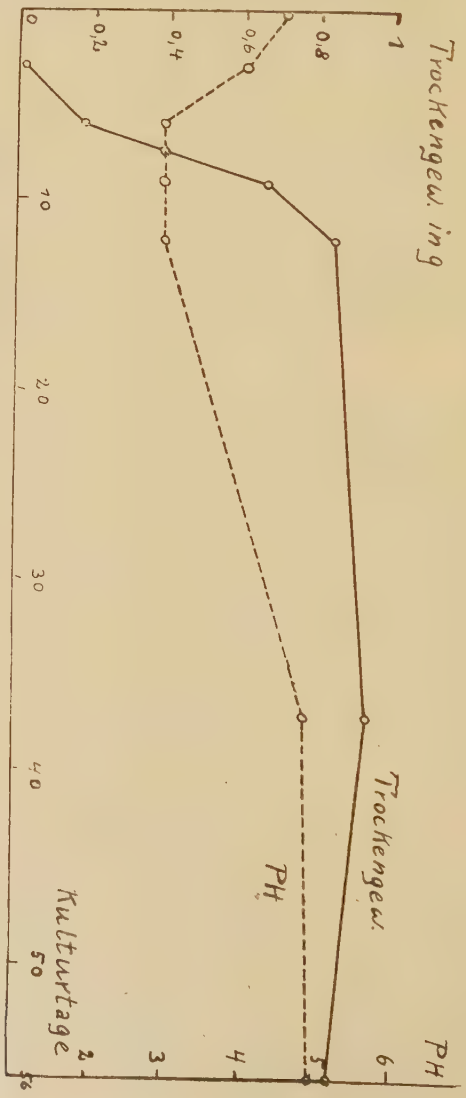


Fig. 7. **Aenderung des pH während der Kultur.**
Kulturdauer: 23.III—20.V 1932 = 56 Tage.
0,02% NH_4NO_3 als Stickstoffquelle.

Dieselben Versuchsreihen wurden vom 25.V—6.VII 1932 und vom 4.XI—4.XII 1932 durchgeführt. Sie lieferten prinzipiell dieselben Resultate wie die in Fig. 7 dargestellten.

erfolgt ein Anstieg, so dass nach 2—3 Wochen das pH der ursprünglichen Nährlösung (4,45) wieder erreicht ist. Bei längerer Kulturdauer wird die Nährlösung alkalischer, indem ihr pH nach 25—30 Tagen den Wert von 6,1—6,7 erreicht.

Als Ursache der anfänglich starken Ansäuerung könnte Säurebildung durch den Pilz oder Ionenaustausch in Betracht kommen. Um festzustellen, ob vom Pilz Säuren gebildet werden, wurden die abgeernteten Nährlösungen nach den Angaben von Rosenthaler (1914, S. 348—363), Treadwell (1919, S. 365), Molisch (1923, S. 112), Grafe (1914, S. 262), Bernhauer (1932, S. 160) und Andern auf das Vorhandensein der in Betracht kommenden Säuren untersucht. Der Ausfall der Reaktionen sprach in allen untersuchten Fällen für das Vorhandensein von Weinsäure; allerdings wurden bei Kontrollversuchen mit sterilisierten, aber unbeimpften Nährlösungen ebenfalls einzelne Reaktionen erhalten, die für Weinsäure sprachen*) Immerhin trat z.B. der Silberspiegel stets nur mit Nährlösungen auf, in denen der Pilz gewachsen war. Ein genauer Nachweis könnte offenbar nur durch Isolierung der allenfalls gebildeten Säure geliefert werden; da diese Operation jedoch unterbleiben musste, möchte ich die Frage offen lassen, ob das Fusarium des Limodorum tatsächlich Weinsäure bildet.

Die anfänglich starke Abnahme des pH in der mit Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle versetzten Nährlösung dürfte eher darauf zurückzuführen sein, dass die NH_4-Ionen schneller aufgenommen werden, als die Nitrat-Ionen und dass dann durch Ionenaustausch eine Ansäuerung der Lösung auftritt, die später bei der vermehrten Aufnahme der Nitrat-Ionen sukkzessive wieder zurückgeht. Für diese Annahme spricht die Tatsache, dass in Nährlösungen, denen als Stickstoffquelle nur eine geringe Konzentration von Ammoniumnitrat zugegeben worden war (bis 0,15%), der Gehalt an NH_4-Ionen nach Massgabe des Wachstums abnahm, um schliesslich bei Erreichung des maximalen Trockengewichts und zugleich des niedrigsten pH auf Null abzusinken.

In demselben Sinn ist wohl auch die Beobachtung zu deuten, dass bei Darbietung andrer Stickstoffverbindungen als NH_4NO_3 der Wert des pH am Schluss des Versuchs vom anfänglichen Wert kaum verschieden war (vgl. S. 23 unten).

Um zu konstatieren, wieviel Zeit der Pilz zur Bildung eines maximalen Trockengewichts benötigt, bestimmte ich ausser dem pH auch das Trockengewicht jeder Kultur. Es zeigte sich (Fig.7), dass das Wachstum nach zwei bis drei Wochen fast abgeschlossen war. Nach dieser Zeitdauer war etwa bis zum Ende der fünften Woche nur noch geringer Zuwachs zu konstatieren.

*) Mit Ca-acetat und Kalkwasser Niederschlag, der in Essigsäure löslich und mit Ammoniak ausfällbar ist. Mit K-acetat sowie mit Pb-acetat Niederschläge. Mit Resorzin und Schwefelsäure rote Färbung.

Dann erfolgte eine langsame Abnahme des Trockengewichts; gleichzeitig wurden die Kulturen breiig und schleimig, obwohl sie nachgewiesener Massen bakterienfrei waren, und es trat Autolyse ein. Das mikroskopische Bild zeigte viele Sporen und verkümmerte Fäden mit sehr wenig Zellinhalt. Nährstoffmangel konnte jedoch diesen Zustand nicht verursacht haben, da sich auf der abfiltrierten Nährlösung ein neuer Rasen bildete, der allerdings die Grösse und Dicke des ersten Pilzrasens nie erreichte.

Tab. 7 **Einfluss des pH.**

Normale Nährlösung + KH_2PO_4 (sauer) / Na_2HPO_4 (basisch) } 10.0

Kulturdauer: 16.V—10.VI 1933 = 24 Tage.

Kolb.	Zu Beg. pH	Beim Abschluss d. Versuche pH	Zuckergehalt	Trock. Gew.
1	3,70	3,60	+	0,07
2		3,30	+	0,014
1	4,30	4,95	+	0,895
2		4,75	+	0,660
1	5,5	6,40	—	1,00
2		6,25	—	1,18
1	6,5	6,60	—	1,48
2		6,70	Spur	1,48
1	7,5	7,40	—	1,428
2		7,40	Spur	1,466
1	8,5	5,73	+	0,25
2		5,99	+	0,22
1	9,5	9,23	Spur	1,324
2		8,72	Spur	1,250

5. Einfluss des Sauerstoff-Entzugs.

Dass der Wurzelpilz von Limodorum sauerstoffbedürftig ist, habe ich S. 11 erwähnt. Es musste nun noch untersucht werden, ob er auch mit geringen Mengen oder bei völligem Ausschluss dieses Gases leben könne. Für diese Versuche wurde dieselbe Nährlösung und dieselbe Art der Kulturkolben verwendet, wie bei den Versuchen bei Sauerstoffzutritt. Die einen Kolben beschickte ich mit Stickstoff-haltiger, die anderen mit Stickstoff-freier Nährlösung. Die durch alkalische Pyrogallollösung von Sauerstoff mehr oder weniger befreite und in Schwefelsäure und Kaliumpermanganat gereinigte Luft wurde nach Passage destillierten Wassers und eines sterilen Wattefilters während $2^1/_2$ Stunden durch die Kolben gepresst In allen Kolben, deren Nährlösung Stickstoff enthielt, konnte deutliches Wachstum festgestellt werden (Tab. 8); ergab sich doch ein Trockengewicht bis zu 0,54 gr. In den Kolben jedoch, die in der Nährlösung keinen Stickstoff enthielten, war das Wachstum kaum wahrnehmbar (Trockengewicht — 0,03 — 0,05 gr.).

Tab. 8 **Einfluss anaerober Kultur bei Vorhandensein oder Fehlen von N-Verbindungen (0,5% Ammoniumnitrat).**

Nährlösung: normal, sonst aber N-frei.
Kulturdauer: 27.VI—19.VII 1933 = 22 Tage.

Mit NH_4NO_3			Kolb.	Ohne NH_4NO_3		
pH Anfang	pH Schluss	Trock. Gew.		pH Anfang	pH Schluss	Trock. Gew.
4,25	4,05	0,54	1	4,30	3,90	0,03
„	3,80	0,36	2	„	„	0,05
„	3,80	0,33	3	„	„	0,04
„	4,00	0,31	4	„	„	0,03

Dieselben Versuchsreihen wurden vom 28.XI—12.XII 1932, vom 15.XII 1932 — 18.I 1933, und vom 11.II—6.III 1933 durchgeführt. Sie ergaben dasselbe Resultat wie das in Tab. 8 enthaltene.

Diese Versuche mit Sauerstoffentzug habe ich unter Anwendung einer verbesserten Technik mehrmals wiederholt. Diese bestand darin, dass dabei Kolben verwendet wurden, deren Hals einen erweiterten Glasansatz besass, welcher ein Ueberschichten der Gummipropfen mit einer Quecksilberschicht ermöglichte. Auf diese Weise konnte der Kolbeninhalt von der Aussenluft vollständig abgeschlossen werden.

Ausserdem presste ich in diesen Versuchen anstelle der von Sauerstoff mehr oder weniger befreiten Luft nunmehr Stickstoff durch die Kolben. Dieser wurde einer Stahlflasche entnommen, verschiedentlich gewaschen und mit alkalischer Pyrogallollösung sowie vermittelst Durchleiten durch ein Glasrohr mit glühender Kupferspirale von den letzten Spuren des Sauerstoffs befreit (Phosphorprobe!). Nachdem der Stickstoff die in den Kolben enthaltene Luft völlig verdrängt hatte, wurden die Zuleitungsröhren des Kolbens zugeschmolzen. Das Resultat bestand darin, dass nunmehr weder in Stickstoff-haltiger noch Stickstoff-freier Lösung die geringste Spur eines Wachstums zu verzeichnen war. Die Möglichkeit, dass etwa das geimpfte Pilzmyzel nicht wachstumsfähig gewesen wäre, und deshalb dieses Ergebnis des Versuchs verursacht hätte, bestand nicht. Denn nach Durchleiten von Luft wuchsen die geimpften Flocken normal aus, ungeachtet dessen, dass sie sich 4 Wochen lang in Anaerobiose befunden hatten. Der Sauerstoffmangel hatte also den Pilz nicht getötet, sondern nur im Wachstum gehemmt.

Diese Versuche wurden noch in der Weise modifiziert, dass an Stelle des fehlenden Sauerstoffs ein anderer Wasser-

stoffacceptor, nämlich Methylenblau in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wurde. Auch hier war jedoch nicht das geringste Wachstum festzustellen. Der Limodorum-Pilz ist also offenbar nicht fähig, unter anaeroben Bedingungen zu wachsen.

6. Assimilation des molekularen Stickstoffs der Luft.

Eine wichtige Frage, die es noch zu beantworten galt, war die, ob der Pilz den molekularen Stickstoff der Luft assimilieren könne oder nicht. Manche Forscher haben gewissen Pilzen diese Fähigkeit zugesprochen. (Schober 1930, Wolff 1926, 1931). So fand Wolff bei der Mycorrhiza von *Neottia Nidus avis, Coralliorrhiza* etc. Assimilation des molekularen Stickstoffs der Luft. Die Zugabe von Stickstoffverbindungen beeinflusste nur die Entwicklung des Pilzes, dagegen nicht dessen Assimilation des Luft-Stickstoffs. Andere Forscher konnten jedoch eine Assimilation bei den von ihnen untersuchten Pilzen nicht feststellen; unter ihnen Burgeff (1909 S. 34), Huber (1921 S. 325), Schröder (1932) und Holländer (1932). Im Besondern konnte letzterer die von Wolff für den *Neottia*-Pilz festgestellte Assimilation des Luftstickstoffs nicht bestätigen.

Die Vorversuche, in denen ich den Limodorum-Pilz in Stickstoff-freier Nährlösung und in Nährlösung mit verschiedenen Stickstoffkonzentrationen kultivierte, sprachen von vornherein nicht dafür, dass er den Stickstoff der Luft assimilieren könne. Nur wenn in den Vorversuchen die Nährlösungen mit nicht völlig reinen Chemikalien hergestellt worden waren, konnte ein sehr schwaches Wachstum beobachtet werden; doch blieb das Myzel untergetaucht, bildete einen dünnen Schleier und liess im Mikroskop dünne, fast inhaltslose Fäden erkennen. Sein Trockengewicht war jedoch so klein, dass es nicht bestimmt werden konnte. Nach Entfernung der Nährlösung blieb nämlich nur etwas schleimige Substanz zurück, welche nach dem Trocknen im Wägegläschen nur einen kleinen Flecken zurückliess, der das Gewicht des Gläschens nicht wägbar erhöhte. Dieses Wachstum war offenbar nur infolge von Verunreinigungen der verwendeten Chemikalien, speziell der Glukose, durch Stickstoffverbindungen zustande gekommen. Wurden dagegen chemisch reinste Nährstoffe von Kahlbaum oder Merck verwendet, so blieb das Wachstum völlig aus. Auch wird es stark gehemmt, wenn die Stickstoffverbindungen in ungenügender Menge geboten werden.

Diese Versuche liessen vermuten, dass der Limodorum-Pilz den freien Stickstoff der Luft nicht binden könne. Es wäre jedoch möglich, dass er diese Fähigkeit besitzt, solange er sich in der Orchideenwurzel befindet, sie jedoch während der Kultur in künstlichen Medien verliert. Nun fand ich bei G. Bredemann (1908 S. 362) Angaben über Versuchsergebnisse, die zeigen, dass es ebenso leicht ist, das Stickstoffbindungsvermö-

gen von Bakterien-Stämmen, die schon lange in Kultur waren und diese Fähigkeit verloren hatten, zu regenerieren, wie bei Stämmen, welche nachgewiesenermassen den molekularen Stickstoff der Luft nicht binden konnten, diese Fähigkeit durch die Bodenpassage hervorzurufen. Als besonders günstig zu diesem Zwecke hatte sich die Kultur auf steriler Erde oder auf Substraten erwiesen, welche Erde enthalten. Um eventuell auch den Limodorum-Pilz zu einer Stickstoffassimilation anzuregen, wandte ich Boden-Passagen an. Der Pilz wurde entweder auf steriler Erde, oder auf Bodenextrakt-Nährböden (L ö h n i s 1910 S. 521) kultiviert. Bei Zugabe von ausschliesslich anorganischen Salzen zur Erde oder zum Bodenextrakt erfolgte kein Wachstum. Erst bei Zugabe der vollständigen Nährlösung trat gute Rasenbildung ein. Impfte ich mit diesem Myzel Stickstoff-freie Nährlösungen, um jetzt eine eventuelle Stickstoffassimilation konstatieren zu können, so erhielt ich die gewöhnlichen Resultate, d. h. es fand in Stickstoff-freiem Medium kein Wachstum statt.

Versuche mit stimmulierenden Substanzen wie Kupfersulfat, Eisensulfat und Zinksulfat führten zu keinem andern Resultat; in 0,05% Lösung beeinflussten sie das Wachstum der Pilze nicht, veränderten aber ebensowenig ihr Verhalten in Stickstoff-freier Nährlösung.

Obwohl alle diese Versuche gegen die Stickstoffbindung sprachen, führte ich mehrere Analysen zur Stickstoffbestimmung mit der Mikro-Kjeldahl-Methode aus. Zu dem Zwecke wurde durch geimpfte und gleichzeitig auch durch ungeimpfte Kontrollkolben sterile Luft durchgepresst, welche von Ammoniak befreit worden war. Nach drei Wochen wurden alle Kolben auf ihren Stickstoffgehalt untersucht. Das in der Mikro-Kjeldahlapparatur (siehe z. B.: K l e i n 1931, S. 161) abdestillierte Ammoniak wurde kolorimetrisch bestimmt (nesslerisiert!). Vor jeder Analyse überzeugte ich mich durch Blindversuche, dass die Apparatur in Ordnung und sie selbst wie die Reagenzien Stickstoff-frei waren. Zwischen dem Inhalt der geimpften und nicht geimpften Kolben war nach Abschluss der Versuche k e i n U n t e r s c h i e d im Stickstoffgehalt zu konstatieren. Durch diese Analysen ist bewiesen, dass der Wurzelpilz von Limodorum abortivum, wenigstens in Reinkultur, nicht im Stande ist, den molekularen Stickstoff der Luft zu assimilieren.

V. Die gegenseitigen Beziehungen zwischen Limodorum und seiner Mycorrhiza.

Da die mannigfach variierten Versuche ergeben haben, dass der Mycorrhiza-Pilz von Limodorum den Stickstoff der Luft nicht zu assimilieren vermag, kann er der Orchidee keine selbst erzeugten Stickstoffverbindungen liefern. Vielleicht liegt seine Bedeutung darin, dass er die in den abgefallenen Blättern des Waldbodens enthaltene Zellulose in Zucker umsetzt und sie so dem Limodorum zugänglich macht. Diese Fähigkeit könnte

damit im Zusammenhang stehen, dass der Pilz, der ja aus einer Wirtszelle in eine andere hineinwachsen kann, imstande sein muss, die Zellulose - Membran der Limodorum — Zellen zu durchbohren, wobei sie offenbar auf enzymatischem Wege in lösliche Verbindungen übergeführt wird. Daher ist durch den von mir geleisteten Nachweis, dass der Pilz von Zellulose leben kann, nicht bewiesen, dass er der Orchidee durch diese Fähigkeit von Nutzen ist. Um dies zu entscheiden, genügt die Kenntnis des Stoffwechsels des Mycorrhiza-Pilzes allein nicht; wir sollten auch den Stoffwechsel der Wirtspflanze kennen. Bei Limodorum sollte speziell die Frage entschieden werden, ob sein bedeutender Stärkegehalt mit Hilfe des in ihm enthaltenen Chlorophylls erzeugt werden kann, oder ob hierzu noch eine andere Quelle, vielleicht eben der Mycorrhiza-Pilz beitragen muss.

Von den beiden Unbekannten, welche in jedem Mycorrhiza-Problem enthalten sind, ist somit in meiner Arbeit nur die eine, die Lebensweise des Pilzes, näher bekannt geworden. Ob es je gelingen wird auch die zweite Unbekannte, den Stoffwechsel des Limodorum bei Abwesenheit des Pilzes aufzuklären, wie dies bei Calluna vulgaris gelungen ist (Rayner 1925 S. 265), muss die Zukunft lehren.

VI. Zusammenfassung der Resultate.

1. Limodorum-Pflanzen von drei verschiedenen Standorten besitzen Mycorrhiza-Pilze, die morphologisch fast identisch sind, in der Kultur aber auffallend verschiedene Färbungen zeigen. Derjenige zweier Pflanzen aus dem Wallis, nämlich *Fusarium oxysporum Schl.*, wurde rot bis violett (Follaterres) resp. rotbraun (Euloz.), derjenige einer Pflanze aus Südfrankreich, nämlich *Cylindrocarpon didymum (Hort.) Wr.*, dagegen grün. Im Dunkeln blieb das Myzel auf der gewöhnlichen Nährlösung farblos. Auf Malzagar jedoch bildete dasjenige von Follaterres auch im Dunkeln eine dunkelviolette Farbe. Die Bildung von 1—4 zelligen Sporen erfolgte interkalar unter Zerfall der Fäden.

2. Nach Sterilisation der Wurzeln mit Alkohol, oder Bromwasser können durch Herausstechen mycorrhiza-haltigen Limodorumgewebes mit sterilen Kapillaren, oder durch auswachsenlassen sterilisierter Wurzelstücke Reinkulturen des Wurzelpilzes hergestellt werden, die in flüssigen und auf festen Nährböden gedeihen. Das Myzel bildet auf der Nährlösung gewöhnlich einen zähen Rasen, wächst auch an den Wänden des Kolbens hinauf, was wohl auf sein starkes Sauerstoffbedürfnis zurückzuführen ist. Darum bedeckt es bei günstiger Ernährung die gesammte Oberfläche der Kulturflüssigkeit. Sein Trockengewicht hängt darum in weitgehendem Masse von der Grösse der Oberfläche der Nährlösung, d. h. von der Kolbengrösse ab. Bei völ-

ligem Sauerstoffentzug findet kein Wachstum statt, auch dann nicht, wenn der Sauerstoff durch einen andern Wasserstoffakzeptor (Methylenblau) ersetzt wird. Das Durchperlen-lassen von Luft hemmt das Wachstum des Pilzes.

3. Die Grösse der verimpften Flocken hat bei normaler Kulturdauer weder auf das Wachstum, noch auf die Grösse des Trockengewichts Einfluss.

4. Die für das Wachstum günstigste Temperatur liegt bei 20—22° C. Höhere Temperaturen 30—32° C. bewirken schnelles Wachstum, jedoch kleineres Trockengewicht. Bei —2 bis +5° C. erfolgt kein Wachstum.

5. Als Kohlenstoffquellen verarbeitet der Pilz hauptsächlich Mono—, Di—, und Polysaccharide (Stärke, Zellulose), Glukoside und organische Säuren. Die optimale Glukosekonzentration liegt bei 5%.

6. Als Stickstoffquellen werden vom Pilz verwendet: Nitrate, Nitrite, Ammoniumsalze und organische Stickstoff-verbindungen. Besonders günstig ist Ammonium-Nitrat in 0,5% Konzentration.

7. Die günstigste Konzentration des Kalium-Phosphats ist 1%, des Magnesiumsulfats 0,2%.

8. Die optimale Wasserstoff-Ionen-Konzentration liegt bei einem pH von 5,25—7,50. Wenn als Stickstoffquelle NH_4 NO_3 geboten wird, so sinkt das pH vom zweiten Tag der Kultur bis zum zwölften Tag auf 2,9. Dann steigt es bis auf die ursprüngliche Höhe, oft auch darüber.

9. Ob der Pilz Weinsäure bildet, wie einige Reaktionen angaben, konnte nicht mit Bestimmtheit nachgewiesen werden.

10. Nach 4—5 Wochen ist das Wachstum beendet; nach dieser Zeit nimmt das Trockengewicht infolge Autolyse ab.

11. Assimilation des molekularen Luftstickstoffs konnte nicht festgestellt werden, weder in stickstoffhaltiger noch in stickstoff-freier Nährlösung. Versuche, den Pilz zur Bindung des molekularen Stickstoffs durch Bodenpassage oder durch Zugabe von Metallsalzen anzuregen, blieben erfolglos.

12. Die Bedeutung des Pilzes für Limodorum liegt vielleicht darin, dass er dieser Orchidee aus der Zellulose abgefallener Blätter gelöste Kohlenhydrate zuführt.

Literatur-Verzeichnis.

1932. Bernhauer, K. Die oxydativen Gärungen. Berlin, Springer.
1908. Bredemann, G. Regeneration der Fähigkeit zur Assimilation von freiem Stickstoff des Bacillus amylobacter. Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd. 26a S. 362—367.
1909. Burgeff, H. Die Wurzelpilze der Orchideen. Jena, G. Fischer.
1919. Folin und Wu. A System of Blood analysis. Journ. of Biol. Chem. Bd. 38, S. 81—110.
1888. Frank, B. Ueber die physiologische Bedeutung der Mycorrhiza. Ber. deutsch. bot. Ges. III, S. 248—268.
1892. Frank. B. Lehrbuch der Botanik. Leipzig, W. Engelmann.
1923. Fuchs, A. u. Ziegenspeck, D. Mycorrhiza und Boden. Bot. Arch. Bd. 3, S. 237—261.
1914. Grafe, V. Ernährungsphysiologisches Praktikum der höhern Pflanze. Berlin, P. Parey.
1905. Heinze, B. Reinkultur von Azotobacter und der Wert s. g. Passagekulturen. Zentralblatt für Bakter. Abt. II. Bd. 14.
1932. Holländer, St. Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Wurzelpilzen saprophytisch lebender Orchideen. Diss. Würzburg.
1921. Huber, B. Zur Biologie der Torfmoororchidee Liparis Loeselii. Sitzungsber. der Wiener Akad. d. Wiss., Bd. 130, Abt. 1, S. 307—328.
1928. Janke, A. u. Zikes, H. Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Steinkopff, Dresden und Leipzig.
1932. Kadelbach, E. Ueber Säureresistenz und Rassenbildung bei Aspergillus niger. Jahrb. Wiss. Bot. Bd. 75, S. 399 - 438.
1931. Klein, G. Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. I. Springer, Wien.
1913. Küster, E. Kultur der Mikroorganismen, Leipzig.
1905/07. Lafar, Fr. Handbuch der technischen Mycologie. Jena, G. Fischer.
1910. Löhnis, F. Handbuch d. landwirtschaftlichen Bacteriologie. Berlin, Borntraeger.
1911. Löhnis, F., Landwirtschaftlich-bakteriologisches Praktikum. Berlin, Borntraeger.
1925. Melin, E. Untersuchungen über die Bedeutung der Baummycorrhiza. Jena, G. Fischer.
1928. Mevius, W. Die Wirkung der Ammoniumsalze in ihrer Abhängigkeit von der CH-Konzentration. Planta Bd. 6, S. 380—455.
1923. Molisch, H. Mikrochemie der Pflanze. Jena, G. Fischer.
1906. Möller, A. Mycorrhizen und Stickstoffernährung. Ber. deutsch. Bot. Ges. Bd. XXIV, S. 230—233.

1903. Müller. P. E., Om bjergfyrreus forhold til rodgrauen . . . Tidskr. f. Skovbr. 1903, Suppl., (cit. nach Melin 1925).
1926. Prianischnikow, D. N. Ammonium, Nitrate und Nitrite als Stickstoffquellen für höhere Pflanzen. Ergeb. d. Biolog. Bd. I, S. 407—446.
1925. Rayner, M. C. The Nutrition of Mycorrhiza Plants. Calluna vulgaris. The British Journal of Experimental Biology Bd. 2, S. 265—292.
1911. Remy, Th. u. Rosing, G. Biologische Reizwirkung natürlicher Humusstoffe. Zentralblatt für Bakteriologie Abt. II, Bd. 30. S. 349—384.
1914. Rosenthaler, L. Nachweis organisch-chemischer Verbindungen. Stuttgart, F. Enke.
1930. Schober, R. Luftstickstoff-Assimilation und Säurebildung bei Aspergillus niger. Jahrb. wiss. Bot. Bd. 72, S. 1—105.
1931/32. Schröder, M. Die Assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bacterien. Zentralblatt für Bacteriologie Bd. 85, Abt. II, S. 177—211.
1932. Schröder, M. Zur Frage der Assimilation des Luft-Stickstoffs durch Aspergillus niger. Jahrb. wiss. Bot. Bd. 75. S. 376—397.
1900. Stahl, E. Der Sinn der Mycorrhizabildung. Jahrb. wiss. Bot. Bd. 34, S. 539—668.
1932. Tamiya, H. Ueber die Verwendbarkeit von verschiedenen Kohlenstoff-Verbindungen im Bau- und Betriebsstoffwechsel der Schimmelpilze. Acta phytochimica Bd. VI. S. 1—129.
1904. Ternetz, Ch. Assimilation des atmosphärischen Stickstoffs durch einen torfbewohnenden Pilz. Ber. deutsch. Bot. Ges. Bd. XXII, S. 267—274.
1907. Ternetz, Ch. Ueber die Assimilation atmosphärischen Stickstoffs durch Pilze. Jahrb. wiss. Bot. Bd. 44, S. 353—408.
1919. Treadwell, W. D. Lehrbuch der analytischen Chemie. Leipzig u. Wien, F. Deuticke.
1926. Wolff, H., Zur Physiologie des Wurzelpilzes von Neottia nidus avis Rich. und einiger grünen Orchideen. Jahrb. wiss. Bot. Bd. 66, S. 1—32.
1933. Wolff, H. Zur Assimilation atmosphärischen Stickstoffs durch die Wurzel-Pilze von Coralliorrhiza innata R. Br. sowie der Epiphyten Cattleya Bowingiana Veit. und Laelia anceps Ldl. Jahrb. wiss. Bot. Bd. 77, S. 657—684.
1928. Wollenweber, H. W. Ueber Fruchtformen der krebserregenden Nectriaceen. Zeitschr. f. Paras.-Kde, Bd. 1, S. 138—173.
1931. Wollenweber, H. W. Fusarium-Monographie, Fungi parasitici et saprophytici. ebenda Bd. 3, S. 269—516.
1932. Wollenweber, H. W. Fungi imperfecti, Hyphomycetes in: Sorauer, Handb. d. Pflanzenkrankheiten, 5. Aufl. Bd. 3, S. 577—819.
1935. Wollenweber, H. W. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. P. Parey, Berlin.

Curriculum vitae.

Ich, Haija Blumenfeld, wurde am 4. Februar 1910 in Tuckum (Lettland) geboren. Meine Eltern sind Moses Blumenfeld, Kaufmann, aus Tuckum (Lettland) und Mary Blumenfeld, geb. Weinberg.

Bis 1927 besuchte ich das Gymnasium in Riga (Lettland), an welchem ich im Sommer 1927 die Maturitätsprüfung ablegte.

Meine Studien absolvierte ich an den Universitäten Basel (Herbst 1928 bis Frühling 1931 und Herbst 1931 bis Winter 1934/35) und Genf (Sommer 1931).

Während meiner Studienzeit besuchte ich Vorlesungen und Praktika folgender Herrn Professoren und Dozenten:

Basel: Doerr, Fichter, Ganz, Geiger, Häberlin, Hagenbach, Handschin, Mahler, Pfuhl, Portmann, Rupe, Schüepp, Senn, Vischer, Zinkernagel, Zschokke.

Genf: Chodat, Guyenot, Karcevski.

Meine Dissertation verfasste ich unter Leitung von Herrn Professor G. Senn.

Allen meinen verehrten Lehrern danke ich bestens für die Förderung, die sie mir während meiner Studien haben angedeihen lassen.